# DIE CALCIUMSEKRETION AM ISOLIERT DURCHSTRÖMTEN HUNDEPANKREAS

Kohan Go

Diss. München
1984

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544319_0014

Aus der II.Medizinischen Klinik der Universität
München
Direktor: Prof.Dr.E.Buchborn

# Die Calciumsekretion am isoliert durchströmten Hundepankreas

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Kohan Go
aus Indonesien

München 1983

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin

der Universität München

Berichterstatter: Priv.Doz.Dr.H.Teufel

Mitberichterstatter: Prof.Dr.E.Buchborn

Dekan: Prof.Dr.W.Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 16.02.1984

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

# Inhaltsverzeichnis


| | Seite |
|---|---|
| Einleitung | 1 |
| Material und Methodik | 8 |
| Versuchsprotokoll | 12 |
| Bestimmungsmethoden | 14 |
| Ergebnisse | 15 |
| 1. Das Konzentrationsverhalten von Calcium und Protein im Pankreassaft unter hydrokinetischer und/oder ekbolischer Stimulation und das jeweilige Verhältnis von Calcium zu Protein. | 15 |
| 2. Die Sekretion von Calcium und Protein unter synthetischem Sekretin. | 19 |
| a. Die Beziehung zwischen der Calcium- und der Volumensekretion unter synthetischem Sekretin. | 19 |
| b. Die Beziehung zwischen der Protein- und der Volumensekretion unter synthetischem Sekretin. | 21 |
| 3. Die Calcium- und Proteinsekretion unter biologischem und synthetischem Sekretin. | 22 |
| 4. Die Beziehung zwischen der Calcium- und Proteinsekretion unter verschiedenen Stimulationsbedingungen in Gegenwart bzw. Abwesenheit von Calcium im Perfusionsmedium. | 24 |
| 5. Der Calcium-Protein-Quotient | 29 |
| 6. Die Wirkung erhöhter Calcium-Konzentrationen im Perfusat auf die Calcium- und Proteinsekretion. | 32 |

| | Seite |
|---|---|
| Diskussion | 44 |
| Zusammenfassung | 60 |
| Literatur | 63 |

## Die Calcium-Sekretion am isoliert durchströmten Hundepankreas

Die Sekretion von Calcium im Pankreassaft unter hydrokinetischer und ekbolischer Stimulierung wurde sowohl in vivo am Pankreas der Katze (Schulz et al., 30; Case et al., 4,5) und des Hundes (Zimmermann et al., 36,37) als auch in vitro an inkubierten Pankreasfragmenten des Meerschweinchens und des Hasens (Ceccarelli et al., 9; Schreurs et al., 29) untersucht. Die parallele Sekretion von Enzymproteinen und Calcium wurde beim Menschen und am Fistelhund von Goebell et al. (16,17,18) und Hotz et al. (21) beobachtet.

Neben einer Calciumfraktion im Pankreassaft, die an die Enzymproteine gebunden ist, wurde von Argent et al. (1,2), Goebell et al. (16,17,18), Ceccarelli et al. (9) und Schreurs et al. (29) eine proteinunabhängige Calciumfraktion im Pankreassaft angenommen. Von allen Arbeitsgruppen wurde übereinstimmend beobachtet, daß die Calcium-Konzentration im Pankreassekret sowohl nach hydrokinetischer als auch nach ekbolischer Stimulierung wesentlich niedriger war als im Perfusions- bzw. Inkubationsmedium.

Die Calcium-Konzentration im Pankreassaft zeigte nach Ceccarelli et al. (9), sowie Argent et al. (1,2), eine signifikante Korrelation mit der Proteinkonzentration (50 nMol/mg Protein).

Nach Injektion von $^{45}Ca^{++}$-chlorid in vivo nimmt die Radioaktivität im Plasma des Meerschweinchens exponentiell ab und zeigt einen raschen, entsprechenden Anstieg im durch Sekretin stimulierten Pankreassekret.

Der Quotient der $^{45}Ca^{++}$-Konzentration im Pankreassekret und Plasma spiegelt dieselbe Relation wieder, wie sie nach Gabe von radioaktiv markierten Markern des extracellulären Raumes (L3-D-Sorbitol) zu beobachten ist.

Nach ekbolischen Sekretagoga besteht keine Proportionalität zwischen dem Plasmaspiegel von $^{45}Ca^{++}$ und der Radioaktivität im Pankreassaft. Schon wenige Minuten nach Injektion von Caerulein erreicht im Plasmasaft die Ausscheidung von Radio-Calcium ihren Höchstwert.

Aus diesen Studien wurde auf eine intercelluläre Ausscheidung von Calcium geschlossen die von der plasmatischen bzw. extracellulären Calciumkonzentration beeinflußt wird.

Andererseits deutet die Radio-Calciumausscheidung nach ekbolischen Sekretagoga, bei denen eine niedrigere Saftkonzentration von $^{45}Ca^{++}$ auftritt, auf eine Bindung von markiertem Calcium an die Enzymproteine hin. Hierauf weist im Ultrafiltrat von Homogenaten auch die vorwiegende Lokalisation von intercellulärem Calcium in der Fraktion der Zymogengranula ( 36 nMol/mg Protein ) hin.

Im Cytosol der Pankreaszellen ist die Calciumkonzentration wesentlich niedriger als im Extracellulärraum und beträgt $10^{-5}$ bis $10^{-7}$ M.
Es besteht demnach ein hoher Konzentrationsgradient zwischen dem extra- und intracellulären Raum.

Ein Austausch von $^{45}Ca^{++}$ zwischen dem Extracellulärraum und den Zymogengranula ist nachweisbar. Er läuft schneller ab als der Einbau von markierten Aminosäuren. Der Quotient von $^{45}Ca^{++}$ zum Proteingehalt der Zellorganellen ist beträchtlich niedriger als der entsprechende Wert im ekbolisch stimulierten Pankreassaft.

Hieraus wurde von Ceccarelli auf 2 Calciumfraktionen im Pankreassaft geschlossen: (9)
Eine Calciumfraktion scheint durch transmembranöse Diffusion in Verbindung mit der Elektrolyt-Sekretion intraluminal freigesetzt zu werden.

Die zweite $Ca^{++}$-Fraktion steht in enger Verbindung mit der Exozytose der Enzym-Proteine.
Der zweiten $Ca^{++}$-Fraktion kommt anteilmäßig die größere Bedeutung zu.

Nach Untersuchungen von Stein et al. (32) bindet ein Molekül Amylase ein Atom Calcium. Ionisiertes Calcium im Pankreassaft ist zur Aufrechterhaltung der molekularen Konfiguration der Hydrolasen (Trypsinogen, Chymotrypsinogen, Praephospholipase-A und Lipase) sowie für die Aktivität von Trypsin, Lipase und Phospholipase notwendig. Das Verständnis der verschiedenen Sekretionsmechanismen des Calciums ist aus diesen Gründen von Bedeutung.

Die Konzentration von Calcium im unstimulierten Pankreassekret schwankt zwischen 1,7 und 3 mEq/l beim Menschen, sowie zwischen 2,2 und 5,5 mEq/l im Basalsekret des Hundepankreas (Goebell et al., 16,17,18; Herskovič et al., 22; Zimmermann et al., 37; Domschke et al., 13).

Nach Stimulation durch Sekretin nimmt die Calciumkonzentration im Pankreassaft mit steigender Sekretionsrate ab und erreicht Werte zwischen 0,5 und 1 mEq/l. (Argent et al., 1,2; Case et al., 4,5, 6,7,8; Goebell et al., 18; Zimmermann et al., 36,37)

Bei hohen Sekretionsraten des Pankreassaftes ist die Calciumkonzentration von der Sekretionsrate unabhängig konstant. Bei zusätzlicher Stimulierung mit ekbolischen Sekretagoga korreliert die Calciumkonzentration mit der ausgeschiedenen Enzymmenge. ( Argent et al., 1,2; Goebell et al., 16,17,18; Zimmermann et al., 36,37 )

Die an Enzymproteine gebundene Calciummenge wurde im Pankreassaft des Hundes nach Beobachtungen von Goebell et al. ( 18 ) mit 50 nMol/mg Protein angegeben.

Die Bindung von Calcium an die im Rahmen der Exocytose freiwerdenden Enzymproteine scheint nach den Untersuchungen von Ceccarelli et al. ( 9 ) nach der Proteinsynthese im Golgi-Komplex stattzufinden.

Am Pankreas des Hundes, der Katze und des Meerschweinchens ( Goebell et al., 16,17,18; Argent et al., 1,2; und Ceccarelli et al., 9 ), wird neben dem proteingebundenen Calcium eine proteinunabhängige Calciumfraktion im Pankreassaft angenommen.

Diese Auffassung stützt sich auf den Ordinatenabschnitt, den die Regressionsgerade aus der Korrelation von Protein- und Calciumkonzentration bei einer Proteinkonzentration von x=o (Argent et al.,1,2 ) ergibt.

Der Mechanismus der Ausscheidung einer proteinunabhängigen Calciumfraktion ist unbekannt.
Es wird auf Grund der Untersuchungen von Ceccarelli et al. (9) eine passive Diffusion aus dem interstitiellen Raum in das Ganglumen angenommen. (Goebell et al., 16,17,18)

Möglicherweise findet auch eine aktive Calciumausscheidung im Zusammenhang mit der Elektrolytsekretion statt. (Argent et al., 1,2; Ceccarelli et al., 9) Hierauf weist der Anstieg der Calciumkonzentration im Pankreassaft nach Erhöhung der plasmatischen Calciumkonzentration hin.

Diese Zunahme ist größer als sie dem Anstieg der Proteinausscheidung entspricht. (Argent et al., 1,2) Eine proteinunabhängige duktuläre Calciumfreisetzung könnte für die Pathogenese der calcifizierenden Pankreatitis von Bedeutung sein.

Die Größenordnung der proteinunabhängigen Calciumfraktion ist nach den in vitro Versuchen von Schreurs et al. (29) und Ceccarelli et al. (9) von den methodischen Bedingungen bei der Homogenisierung und Fraktionierung subcellulärer Strukturen abhängig und dadurch unsicher.

Bei den meisten Versuchsanordnungen wurde nur biologisch reines Sekretin, Karolinska Institut, GIH Unit, (Prof. Mutt) verwendet, das noch Anteile

ekbolisch wirksamer gastrointestinaler Polypeptide z.B. CCK enthält. Somit ist die Möglichkeit einer zusätzlichen Enzymfreisetzung und einer damit gekoppelten Calciumsekretion nicht ausgeschlossen.

Ziel dieser Arbeit ist die Festlegung einer quantitativen Beziehung zwischen der Sekretion von Calcium und Protein, sowohl am isoliert durchströmten Pankreas des Hundes (in vitro) als auch am narkotisierten, laparotomierten Versuchstier. (in vitro).

Dabei soll das Verhältnis der Konzentration und Gesamtausscheidung von Calcium im Pankreassaft sowohl zur Protein- als auch zur Volumensekretion unter verschiedenen Stimulationsbedingungen untersucht werden:

a.) im basalen, unstimulierten Pankreassekret,

b.) unter ausschließlicher hydrokinetischer Stimulierung mit synthetischem Sekretin (Prof.Wünsch)

c.) nach unterschiedlicher ekbolischer Stimulierung mit Pankreozymin (CCK-Prof.Mutt) bei konstanter Sekretionsrate des Saftflusses unter einer kontinuierlichen Infusion von synthetischem Sekretin (Prof. Wünsch).

d.) in Abhängigkeit von Änderungen der extracellulären Calciumkonzentration.

Hieraus sind Aussagen zu erwarten über:

a.) die Größenordnung der proteinassoziierten bzw. proteinunabhängigen Calciumfreisetzung,

b.) die Abhängigkeit beider Calciumfraktionen von der Enzym-, Elektrolyt- und Volumensekretion und

c.) den Einfluß der plasmatischen Calciumkonzentration auf das quantitative Verhältnis von Protein und Calcium im Pankreassekret unter verschiedenen Funktions- und Stimulationsbedingungen.

## Material und Methodik:

Die Untersuchungen wurden am isoliert durchströmten Hunde-Pankreas durchgeführt. Durch die vollständige Skelettierung des Organes und die extrakorporale Durchströmung mit konstantem Druck und Minutenvolumen gelingt es, die exkretorische Pankreasfunktion in strenger Abhängigkeit von den zu prüfenden Versuchs- und Stimulationsbedingungen zu untersuchen.

Überlagernde Einflüsse, wie sie bei Versuchsmodellen in vivo angenommen werden müssen, z.B. endogene Freisetzung von Hormonen und Neurotransmittern, Veränderungen der Zirkulation und neurale, regulatorische Mechanismen entfallen bei dem gewählten Versuchsmodell.

Zudem wurde im Gegensatz zu anderen Perfusionsmodellen (-I.Schulz et al., 30) der eng mit dem Pankreaskopf verwachsene Duodenalstumpf durch sorgfälltige Präparation ohne Läsion des Organes entfernt.

Alle Studien wurden an Bastard-Hunden von 20 bis 40 kg Körpergewicht nach 12-stündigem Fasten durchgeführt.

Die operative Präparation erfolgte in Intubationsnarkose (Pentobarbital).

Nach einem Rippenbogenrandschnitt wurde durch eine totale Gastrektomie und Splenektomie das Pankreas freigelegt. Sämtliche damit in Verbindung stehenden Netzanteile wurden durchtrennt und der Ductus pancreaticus major mit einer Polyäthylensonde in seiner intramuralen Verlaufsstrecke an der Duodenalwand kanüliert. Der accessorische Pankreasgang wurde unterbunden.
Nach Freilegung des Hauptstammes der A. mesenterica superior wurden sämtliche mesenterialen Gefäße distal des Abgangs derA. pancreatico-duodenalis inferior unterbunden. ( siehe Abb. 1 )
Im Anschluß daran werden sowohl die A. lienalis im Bereich des Milzstiels als auch die A. mesenterica superior distal des Abgangs ihres Pankreasastes kanüliert. ( Polyäthylenkatheter )

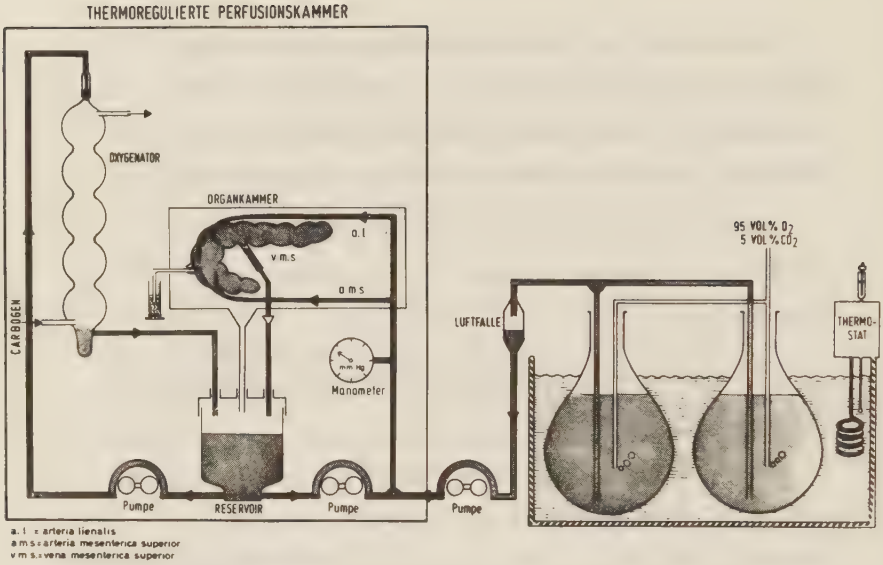



Abb.1: Schematische Darstellung des Perfusionssystems. Alle verwendeten Teile sind in einer thermoregulierten PVC Kammer bei 38°C untergebracht. Das Pankreas wird in einer eigenen Organkammer aus PVC geschützt. Oxygenierungs- und Organkreislauf sind voneinander getrennt. Die $O_2$-Sättigung des Perfusatgemisches im Reservoir beträgt annähernd 100 %. Kontinuierliche Überprüfung durch eine $O_2$- Elektrode (Fa. Hillerkus,Krefeld). Im Falle einer nicht-rezirkulierenden Perfusion werden 2-4 l Krebs-Henseleit-Bikarbonat-Puffer (KHB) in einem thermoregulierten Wasserbad außerhalb der Perfusionskammer auf 38°C eingestellt und mit einem Gasgemisch aus 95 Vol% $O_2$ und 5 Vol% $CO_2$ durchströmt.

Abkürzungen: a.l. - arteria lienalis; a.m.s. - arteria mesenterica superior; v.m.s. - vena mesenterica superior.

Unmittelbar nach Einlegen dieser arteriellen Katheter werden die beiden, das Pankreas versorgenden arteriellen Gefäße, retrograd mit praeoperativ entnommenem heparinisierten Blut über das extrakorporale Perfusionssystem durchströmt (Abb. 1).

Nach Start der retrograden Perfusion werden die A.lienalis und A.mesenterica superior unmittelbar an ihrem aortalen Ursprung ligiert und durchtrennt. Der venöse Rückfluß erfolgt nach Massenligatur des Leberhilus (Unterbindung der V.porta und A.hepatica) retrograd über eine, in die V.mesenterica superior liegende großlumige Kanüle und wird in das Blutreservoir (Abb. 2) des nunmehr geschlossenen Perfusionskreislaufes zurückgeleitet.

Durch die bereits vor der endgültigen Organentnahme in situ beginnende Perfusion wird die Durchblutung zu jedem Zeitpunkt voll aufrecht erhalten. Während der gesamten Präparation wird eine mechanische Irritation des Pankreas weitgehend vermieden.

Das Organ wird nun in eine eigene durchsichtige Organkammer innerhalb des termoregulierten Perfusionsgehäuses gebracht. Hierdurch wird es vor Austrocknung geschützt. Die Durchströmung erfolgt mit autologem, praeoperativ entnommenem Blut (200 ml). Der Perfusatspiegel von $NaHCO_3$ und Glucose wird durch Substitution konstant gehalten. Hierzu dient die fortlaufende Kontrolle von $PO_2$, $PCO_2$, des Standard-Bikarbonates und PH.

Nach einer Vorperiode von 30 Min. die zur Äquilibrierung konstanter Versuchsbedingungen dient (Temperatur, Druck, Blutgase) beginnt die Versuchsperiode der verschiedenen Testbedingungen. Im Falle der Versuche mit offenem Perfusionssystem und Durchströmung mit hämoglobinfreier Krebs-Henseleit-Lösung wird nach der oben erwähnten Vorperiode auf das neue Medium umgeschaltet und eine weitere Äquilibrierung über 15 Min. durchgeführt.
Diese offene Durchströmung mit Krebs-Henseleit-Lösung (KHB+2,5 mM $Ca^{++}$) ermöglicht den kurzfristigen Wechsel auf ein calciumfreies Perfusionsmedium.

Zusammensetzung der Krebs-Henseleit-Lösung:

in mMol/l: NaCl 125, KCL 4,3, $NaHCO_3$ 25, $MgCl_2$ 1,0, $CaCl_2$ 1,25, bzw. 2,5, $NaH_2PO_4$ 1,0, D-Glucose 5, Dextran T 60 60 g/l. Bei Durchströmung mit calciumfreier KHB-Lösung identische Zusammensetzung ohne Zugabe von $CaCl_2$.

Versuchsprotokoll:

Zur Stimulation der Saft- und Elektrolytsekretion wurde biologisch reines Sekretin (Sn) Karolinska Institut, Stockholm (Schweden) oder synthetisches Sekretin (Prof.Wünsch, MPI Martinsried) verwendet.

Die Enzymstimulation erfolgte mit biologisch reinem Cholecystokinin-Pankreozymin (CCK)-Karolinska Institut Stockholm- oder durch Acetylcholinchlorid ( Fa. Merck ).

Die Calcium-Konzentration im Pankreassekret bzw. die Gesamtausscheidung an Calcium wurde zur jeweiligen Sekretionsrate des Pankreassaftes (ml/Zeiteinheit) bzw. zur Konzentration und Gesamtausscheidung der gesamten Enzymproteine im Pankreassaft sowohl bei ausschließlich hydrokinetischer Stimulierung mit Sekretin als auch bei kombinierter hydrokinetischer und ekbolischer Stimulierung in Beziehung gesetzt.

Die Untersuchung der proteinunabhängigen Calciumsekretion erfolgt bei kontinuierlicher, konstanter Infusion von synthetischem Sekretin bzw. von biologisch reinem Sekretin.

Bei ausschließlicher hydrokinetischer oder hydrokinetischer und ekbolischer Stimulation wurde die Calciumausscheidung bei nicht-rezirkulierender Durchströmung sowohl mit calciumhaltiger (2,5 mM) als auch mit calciumfreier Krebs-Henseleit-Bicarbonat-Lösung untersucht.

Der Einfluß erhöhter Perfusatkonzentrationen an Calcium auf die basale (=unstimulierte) oder stimulierte Proteinsekretion wurde am offenen Perfusionssystem durch intraarterielle Injektionen von 1-10 ml $CaCl_2$ ( 110 mM ), bei rezirkulierender Durchströmung mit 200 ml Blut durch Injektion von 1-10 ml $CaCl_2$ ( 110 mM ) in das Blutreservoir untersucht.

Bestimmungsmethoden:

1.) Die Saftsekretion wurde in geeichten Meßzylindern (1 Skalenteil = 0,1 ml ) in 5minütigen Intervallen gemessen.

2.) Die Enzymsekretion wurde durch die Bestimmung des Gesamtproteins im Pankreassaft, das sich nach Lehnert et al. ( 23 ), Wagner et al. und Neurath et al. ( 24 ) nahezu ausschließlich aus Enzymproteinen zusammensetzt, gemessen. Die gleichzeitige Bestimmung von Amylase und Gesamt-Protein ergab in Vergleichsuntersuchungen von Schulz et al.( 29,30 ), Lehnert et al. ( 23 ) und Wagner et al. ein paralleles Sekretionsverhalten, so daß der Nachweis des Gesamtproteins über die Biuret-Reaktion einen zuverläßigen Meßwert der Enzymsekretion darstellt.

3.) Die Calciumkonzentration im Pankreassaft wurde am Atomabsorbtionsspektrometer der Firma EEL, Modell 240, Halstead, Essex bestimmt.

Die statistische Auswertung basiert auf den von L.Sachs 1972 angegebenen Methoden und wurde durch Dipl.math. M.Bauer an einem Siemens-Computer (404/3) durchgeführt: Korrelations- und Regressionsrechnung bei funktionalem Zusammenhang, Prüfung des Korrelationskoeffizienten, Überprüfung des linearen oder parabolischen Zusammenhangs nach der Methode der kleinsten Quadrate, Student-T-Test für gepaarte Daten.

Ergebnisse:

In Abb. 2 werden das Konzentrationsverhalten von Calcium und Protein sowie der Calcium-Protein-Quotient im Pankreassaft unter verschiedenen Stimulationsbedingungen mit der Sekretionsrate des Saftflußes verglichen.

Die Abb. zeigt deutlich das analoge Verhalten der Calcium- und Proteinkonzentration sowohl nach hydrokinetischer als auch nach ekbolischer Stimulierung.

Die quantitative Beziehung beider Parameter wird durch den Quotienten aus der Calcium/Proteinausscheidung pro 5 Min. Sammelintervall illustriert (oberer Teil der Darstellung).

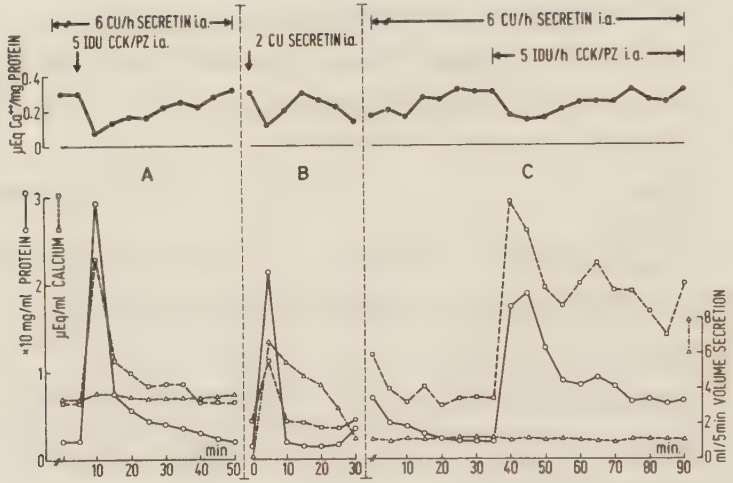



Abb. 2: Ablauf der Protein- o----o , Calcium □----□ und Volumensekretion △----△ (unterer Teil der Abb.) und des Calcium-Protein-Quotienten (oberer Teil der Abb.) nach einmaliger Injektion (i.a.) von 5 Ivy dog Units (IDU) von CCK/PZ bei kontinuierlicher Stimulierung mit Sekretin (Sn) im Falle von A und C. Bei B erfolgt eine einmalige Bolusinjektion von Sn. Die Symbole repräsentieren Meßwerte aus Sammelperioden von jeweils 5 Min. Diese repräsentativen Experimente erfolgten bei rezirkulierender Durchströmung mit 200 ml autologem Blut.

Während des initialen Auswasch-Phänomens der Enzymproteine nach einer Bolusinjektion von Sekretin (B) beträgt der Calcium/Proteinquotient (Q= µEq $Ca^{++}$/mg Protein) $\bar{x} \pm SD = 0{,}094 \pm 0{,}004$ µEq/mg (n=18) und unterscheidet sich nicht signifikant von analogen Werten bei maximaler Enzymsekretion (A) im Gefolge von Bolusinjektionen von CCK oder Acetylcholin bei kontinuierlicher Stimulierung mit Sekretin $\bar{x} \pm SD = 0{,}075 \pm 0{,}05$ µEq/mg (n=15)

Diese Werte sind signifikant niedriger als die entsprechenden Meßwerte unter kontinuierlicher Stimulierung mit Sekretin bzw. Sekretin + CCK bzw. Acetylcholin (Tab. 1).

Bolusinjektionen von hydrokinetischen oder ekbolischen Sekretagoga folgt ein vorübergehender Abfall des Calcium/Protein-Quotienten (Q), der allmählich wieder auf ein Niveau ansteigt, das bei kontinuierlicher Stimulierung vorzufinden ist. (Abb. 2-C)

Während einer ausschließlichen kontinuierlichen Stimulierung mit Sekretin bzw. Sekretin + CCK bzw. Acetylcholin (Tab. 1.I,IV) unterscheiden sich die Q-Werte nicht signifikant (Student-T-Test), obwohl die Proteinsekretion unter ekbolischer Stimulierung das Zwei- bis Vierfache der Meßwerte unter ausschließlicher hydrokinetischer Stimulationsbedingungen beträgt. (siehe Abb. 2-C)

| stimulatory conditions | $Ca^{++}$-conc. (perfusate) | correlation-coeff. | p | y-intercept ± SD | regression-coeff. | Q=µEq $Ca^{++}$/mg protein ($\bar{x}$ ± SEM) | n | No. of experim. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| I SECRETIN [biol.] | 2.5mM | 0.686 | <0.001 | 0.36±0.07 | 2.102 | 0.357 ± 0.014 | 62 | 8 |
| II SECRETIN [biol.] | 0 | 0.717 | <0.001 | 0.05±0.01 | 1.365 | 0.213 ± 0.019 | 48 | 8 |
| III*SECRETIN [synth.] | 2.5mM | 0.695 | <0.001 | 0.47±0.03 | 1.711 | 0.508 ± 0.025 | 123 | 2 |
| III SECRETIN [synth.] | 2.5mM | 0.896 | <0.001 | 0.48±0.02 | 1.623 | 0.469 ± 0.023 | 137 | 2 |
| IV SECRETIN [biol.] + CCK/PZ o. ACH | 2.5mM | 0.762 | <0.001 | 0.52±0.08 | 1.853 | 0.319 ± 0.013 | 96 | 9 |
| V SECRETIN [biol.] + CCK/PZ o. ACH | 0 | 0.739 | <0.001 | 0.08±0.02 | 0.900 | 0.139 ± 0.008 | 147 | 13 |

Tab. 1 Vergleich der statistischen Daten der Calcium-Protein-Korrelationen bei ausschließlicher hydrokinetischer ( I ) und kombinierter hydrokinetischer und ekbolischer Stimulation bei nicht-rezirkulierender Perfusion mit KHB + 2,5 mM $CaCl_2$. II und V geben die Meßwerte von Perfusionsperioden mit calciumfreier KHB-Lösung und analogische Stimulationsbedingungen wie in I und IV wieder. III und III* zeigen die entsprechenden Ergebnisse nach Stimulation mit synthetischem Sekretin. In dem Fall von III*, wurden Proben mit Protein-Konzentrationen über 0,5 g% nicht berücksichtigt um einen Vergleich mit I zu ermöglichen.

Im Folgenden wird das sekretorische Verhalten von Calcium und Protein während hydrokinetischer oder ekbolischer Stimulierung am isoliert perfundierten Pankreas bei rezirkulierender Durchströmung mit autologem Blut untersucht.

Bei Stimulierung mit unterschiedlichen Dosen von synthetischem Sekretin (Wünsch) werden die Calcium- und Protein-Konzentration im Pankreassaft zur jeweiligen Sekretionsrate der Volumensekretion in Beziehung gesetzt.

Hierbei ergibt sich eine annähernd hyperbolische Verteilung der Meßwerte (Abb. 3).

Bei Transformationen der Abszissenwerte also der jeweiligen Sekretionsrate des Saftflusses nach 1:X ergibt sich eine signifikante lineare Beziehung zwischen den jeweiligen Meßwerten, woraus auf eine hyperbolische mathematische Beziehung zwischen der Calcium- und Proteinkonzentration zur jeweiligen Sekretionsrate des Pankreassaftes geschlossen werden kann.

Die Korrelation der Calciumkonzentration mit dem rezibroken Wert der jeweiligen Sekretionsrate des Saftflusses ist signifikant. ($r = 0{,}79$; $n = 137$; $p < 0{,}01$).

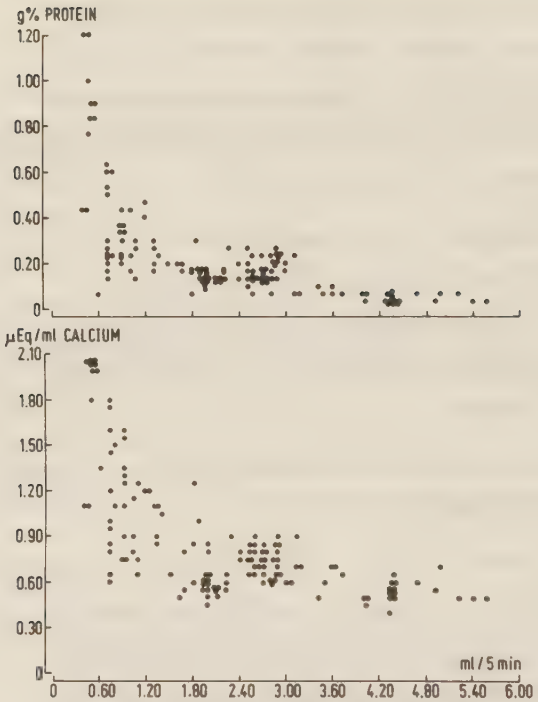



Abb. 3: Die Wechselbeziehung der Protein- ( oben ) und Calciumkonzentration ( unten ) mit der jeweiligen Sekretionsrate des Pankreassaftes (ml/5 Min.) bei ausschließlicher hydrokinetischer Stimulation mit synthetischem Sekretin ( Wünsch ) als Dauerinfusion i.a. bei verschiedener Infusionsgeschwindigkeit ( 10-30 IE Sn/h ). Es wurden nur Perioden mit konstanter Calcium- und Proteinkonzentration verwertet. Die Experimente ( n=2 ) wurden bei rezirkulierendem Kreislauf mit autologem Blut ( $Ca^{++}$-Konzentrationen 4,5 - 5 mEq/l ) durchgeführt.

Die Steigung der Regressionsgeraden (byx= 0,57) und der Ordinatenabschnitt von 0,46 µEq/ml ergeben eine mathematische Funktion, die im vorliegenden Testsystem die Beziehung zwischen der Calcium- und Volumensekretion ausdrückt: $Ca^{++}$ (µEq/ml) = 0,46 + 0,57 x Sekretionsrate $^{-1}$.

Bei hohen Sekretionsraten tendiert die Calciumkonzentration asymptotisch nach 0,46 µEq/ml. (Abb. 3 unten)

Dieser Wert entspricht auch etwa dem Schnittpunkt der Regressionsgeraden aus der Korrelation der Calcium- und der Proteinkonzentration (Tabelle 1,III) mit der Ordinate bei einer Proteinkonzentration von 0 g% und repräsentiert annähernd die proteinunabhängige Calciumfraktion.

Die Korrelation der Proteinkonzentration mit dem jeweiligen rezibroken Wert der Sekretionsrate ergibt ebenfalls bei Überprüfung auf Linearität eine signifikant lineare Regression ($r=0,79$; $p<0,001$, Regressionskoeffizient byx = 0,32).

Die Regressionslinie schneidet die Ordinate bei einer fiktiven Sekretionsrate von 0 ml/5 min. bei 0,1 g% Protein.

Dieser Wert entspricht annähernd den Proteinkonzentrationen um 0,1 g% bei hohen Sekretionsraten des Pankreassaftes (Abb.3, obere Darstellung).

Die Beziehung zwischen der Protein- und Volumensekretion bei ausschließlicher Stimulierung mit Sekretin kann mathematisch folgendermaßen ausgedrückt werden:

$$\text{Protein ( g\% )} = 0{,}01 + 0{,}32 \times \text{Sekretionsrate}^{-1}.$$

Die gesamte Calciumausscheidung pro Sammelperiode von 5 Min. (Abb. 4 unten) korreliert signifikant mit der Sekretionsrate des Pankreassaftes. Bei Zunahme der Sekretionsrate von 0 - 3 ml/5 Min. scheint die Protein-Gesamtsekretion (Bildmitte) in ähnlicher Weise wie die Calciumsekretion anzusteigen, woraus der nahezu konstante Calcium-Proteinquotient (Abb. 4 oben) in diesem Abschnitt der Volumensekretion resultiert.

Die Proteinsekretion zeigt jedoch bei weiterer Steigerung des Saftflusses keinen entsprechenden Anstieg (Bildmitte), da die Proteinkonzentration mit weiterer Zunahme des Saftflusses abfällt. (Abb. 3)

Das unterschiedliche Verhalten der Calcium- und Proteinsekretion resultiert in einem signifikanten Anstieg des Calcium-Protein-Quotienten bei Sekretionsraten des Saftflusses über 3 Ml/5 Min. (Abb. 4 oberer Teil)

Die folgenden Experimente vergleichen die Beziehung der Calcium- und Proteinkonzentration entweder bei kontinuierlicher Stimulierung mit gereinigtem biologischen Sekretin (GIH) oder mit synthetischem Sekretin (Prof. Wünsch).

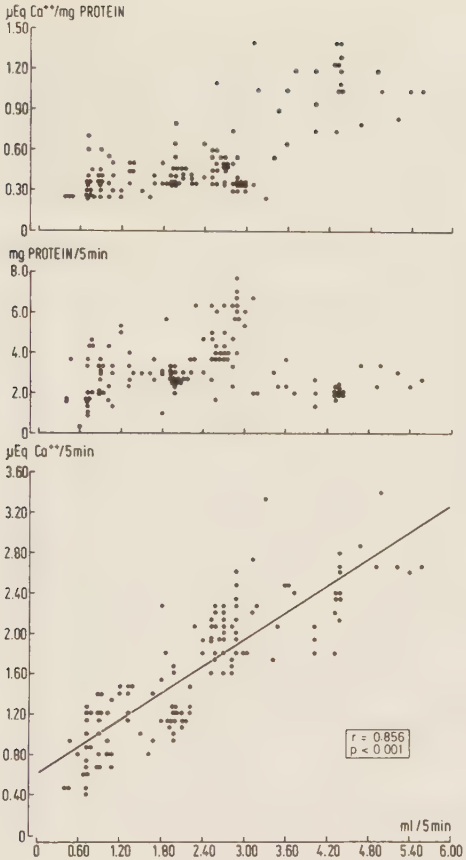



Abb. 4: Die Ausscheidung von Calcium und Protein pro 5 Min. bzw. ihr jeweiliges quantitatives gegenseitiges Verhältnis (Q) zueinander wird mit der jeweiligen Sekretionsrate des Saftflusses bei ausschließlicher Stimulation mit unterschiedlicher Konzentration von synthetischem Sn·(Prof. Wünsch) in Beziehung gesetzt. Rezirkulierende Perfusion mit 200 ml Blut.

Um einen verläßlichen Vergleich zwischen beiden Stimulationsbedingungen zu ermöglichen, wurden jene Calcium- und Proteinkonzentrationen unter synthetischem Sekretin nicht in die Darstellung ( Abb.5 -III*) bzw. in die Berechnung ( Tab.1 ) einbezogen, welche die erreichten Meßwerte unter biologisch reinem GIH-Sekretin ( Abb.5 - I) überschreiten.

GIH-Sekretin wurde bei nicht-rezirkulierender Perfusion mit KHB sowohl in Gegenwart von 2,5 mM Calcium (Abb.5 - I) als auch in Abwesenheit von Calcium im Perfusionsmedium (Abb.5 - II) appliziert.

Die Daten der jeweiligen initialen Auswasch-Periode von Enzymprotein unmittelbar nach Sekretininjektion während der ersten Sammelperiode über 5 Min. wurden nicht berücksichtigt.

Da nur geringe Mengen von synthetischem Sekretin zur Verfügung standen, wurde synthetisches Sekretin unter diesem ökonomischen Gesichtspunkt nur bei rezirkulierender Perfusion mit 200 ml autologem Blut appliziert (Tab.1, III, III*).

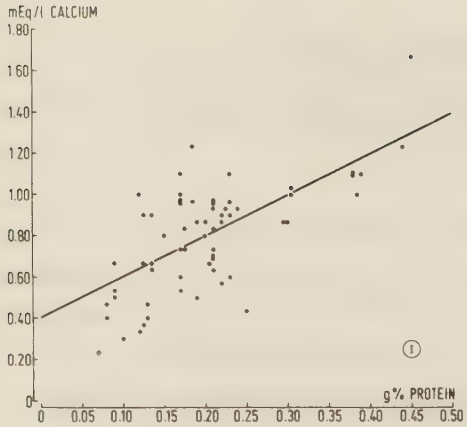
Abb. 5 zeigt eine hochsignifikante Korrelation zwischen der Calcium- und der Proteinkonzentration sowohl bei Stimulation mit biologisch reinem Sekretin (GIH)-I- als auch mit synthetischem Sekretin (Prof.Wünsch)-III*.

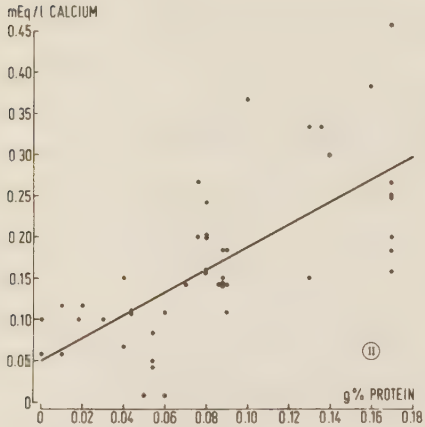
Die Steigungskoeffizienten beider Regressionslinien (Regressionskoeffizienten byx) unterscheiden sich bei mathematischer Überprüfung nicht signifikant. (Tab.1 Abb.5)

Sowohl unter biologisch reinem Sekretin als auch unter synthetischem Sekretin ergibt sich annähernd ein identischer Ordinatenabschnitt von 0,4 mEq/l Calcium für eine fiktive Proteinkonzentration von 0 g%. Dieser Meßwert repräsentiert annähernd die Größenordnung der enzymunabhängigen Calciumfraktion im Pankreassaft (Tab.1 I,II,III*).

Bei vergleichbaren Stimulationsbedingungen führt die Gabe von biologischem Sekretin während der Durchströmungsperiode im calciumfreiem Perfusionsmedium (Abb.5 - III*) zu deutlich niedrigeren Werten der jeweiligen Protein- und Calciumkonzentration im Pankreassaft als in Gegenwart von 2,5 mM $Ca^{++}$ im Perfusionsmedium (Abb.5 - I). Die Korrelation von $Ca^{++}$ und Protein ist jedoch nicht aufgehoben. (Tab.1, II, Abb.5-II-) Auch der Regressionskoeffizient von I,II und III* unterscheidet sich nicht signifikant.

Im Gegensatz zur Darstellung von I geht die Regressionsgerade von II bei Extrapolation für x=o nahezu durch den Nullpunkt (Abb.5).



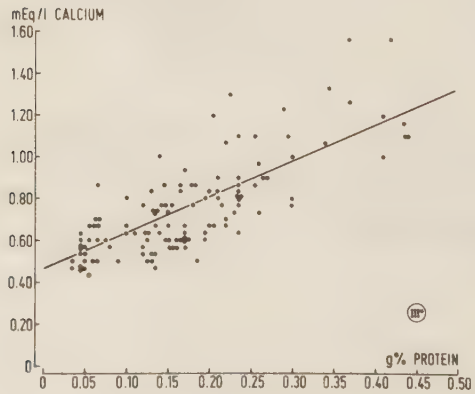
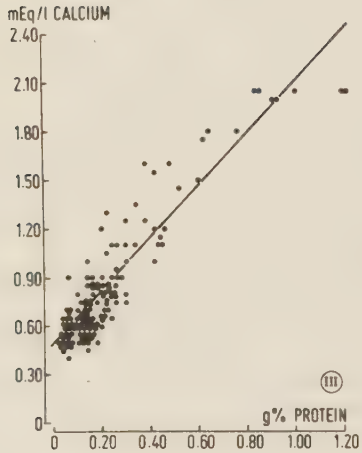



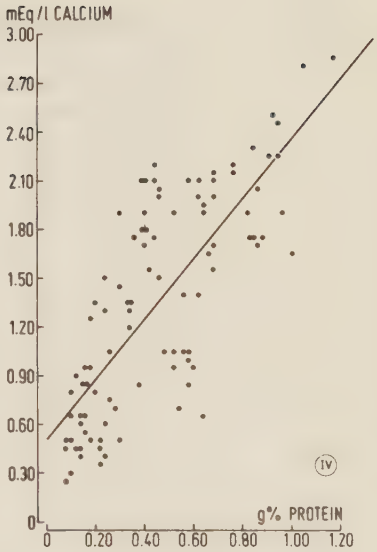

Abb. 5

Legende s.S. 27

Abb. 5: Die Wechselbeziehung zwischen der Calcium- und Proteinkonzentration bei nicht-rezirkulierender Durchströmung mit KHB in Gegenwart (I) oder Abwesenheit (II) von 2,5 mM $CaCl_2$ im Perfusat. Kontinuierliche Infusion von biologischem (Mutt) Sekretin -I- bzw. synthetischem Sekretin (Prof.Wünsch) -III*- bei rezirkulierender Perfusion mit 200 ml autologem Blut. Die individuellen Regressionslinien repräsentieren die Regression von y nach x. Die jeweiligen Korrelationskoeffizienten (r) und die Steigung der Regressionsgeraden (byx) bzw. die verschiedenen Ordinatenabschnitte (ayx) sind in den Ergebnissen beschrieben und in der Tab. 1 zusammengestellt. III bezieht sich nur auf die Daten von Abb. 3, die dem Meßbereich von I entsprechen.

Abb. 6: Vergleich der Calcium-Protein-Relation bei hydrokinetischer und ekbolischer Stimulation. Die Daten von III stammen aus 2 Experimenten (siehe Abb. 3) mit ausschließlicher hydrokinetischer Stimulation durch synthetisches Sekretin. Teil IV zeigt die Beziehung zwischen Calcium und Protein unter fortlaufender Stimulation mit Sn (Mutt) und CCK/PZ bei nicht-rezirkulierender Perfusion mit KHB. (2,5 mM $Ca^{++}$.)Im Falle von -V- wurde unter den gleichen Stimulationsbedingungen mit calciumfreiem Perfusionsmedium über 40 - 60 Min. durchströmt.



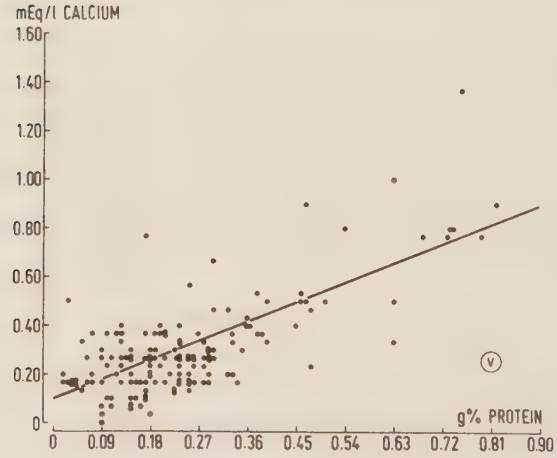




Abb. 6 Legende s.S. 27

Diese Beobachtung ist ein weiterer Hinweis auf die Abhängigkeit der in I und III ermittelten proteinunabhängigen Calciumfraktion, repräsentiert durch den Ordinatenabschnitt (=Calciumkonzentration) bei einer Proteinkonzentration von 0 g% und zeigt die Abhängigkeit dieser Meßgröße von der Gegenwart extracellulären Calciums.

Der Mittelwert des Calcium-Protein-Quotienten unter kontinuierlicher Stimulierung mit Sekretin (GIH) bei Perfusion mit KHB + 2,5 mM Calcium beträgt 0,357 µEq $Ca^{++}$/mg Protein und nimmt im calciumfreien Milieu bei gleichen Stimulationsverhältnissen signifikant ab. (0,213 µEq $Ca^{++}$/mg Protein; $p < 0{,}005$; siehe auch Tab. 1, I und II.)

In Abb. 6 wird die Beziehung der Calcium- und Proteinkonzentration im Pankreassaft bei ausschließlich hydrokinetischer Stimulierung durch synthetisches Sekretin (III*) mit den Meßwerten unter kontinuierlicher Infusion von biologisch reinem Sekretin (GIH) + CCK/PZ (IV) miteinander verglichen.

Aus Abb. 5 geht die Vergleichbarkeit der Calcium- und Proteinwerte unter biologisch reinem (GIH) und synthetischem Sekretin (Prof.Wünsch) hervor.

Die aufgetragenen Meßwerte der Korrelation von III stellen sämtliche ermittelte Daten dar, die unter synthetischem Sekretin ( Tab. 1 III ) ermittelt wurden.

Vergleicht man Steigung ( byx ) und Ordinatenabschnitt der Regressionslinien von III und IV ( Tab. 1, Abb. 6 ), so ergibt sich kein signifikanter Unterschied in der Calcium-Protein-Relation unter ausschließlicher Stimulierung mit Sekretin bzw. unter kombinierter Stimulierung durch Sekretin und CCK.

Die Verteilung der einzelnen Werte unterscheiden sich jedoch unter beiden Stimulationsbedingungen deutlich.

Bei ausschließlicher Stimulierung mit Sekretin sind die Meßwerte im Bereich niedriger Proteinkonzentrationen angeordnet. Unter Stimulierung mit Sekretin + CCK/PZ liegen die ermittelten Meßwerte jedoch über den gesamten Konzentrationsbereich verstreut.

Bei der Durchströmung mit calciumfreiem Perfusat ist auch unter kombinierter Stimulation von Sekretin + CCK eine signifikante Korrelation zwischen der Calcium- und Proteinkonzentration zu beobachten ( Tab. 1 V, Abb.6 V ), wobei jedoch die Meßwerte in einem niedrigeren Konzentrationsbereich liegen.

Die Regressionsgerade geht im Falle von Abb.6 V nahezu durch den Nullpunkt, ihre Steigung ist flacher als in IV ( $p \lesssim 0{,}002$ )

Diese Beobachtung weist darauf hin, daß im calciumfreien Medium bei gleichen Stimulationsbedingungen sowohl die erreichbaren Proteinkonzentrationen als auch der Anteil der enzymabhängigen Calciumfraktion abnimmt.

Der Calcium-Protein-Quotient (Q) bei kontinuierlicher Stimulierung mit biologischem Sekretin ( Tab.1 I. Abb.5 I ) übersteigt nicht die entsprechenden Werte unter Sekretin + CCK/PZ ( Tab.1 IV, Abb.6 IV ), wenn ihre jeweiligen Mittelwerte durch den Student-T-Test verglichen werden.

Bei calciumfreier Perfusion nimmt der Calcium-Protein-Quotient von Sekretin + CCK ( Tab.1 V ) signifikant gegenüber dem entsprechenden Wert von Tab.1 IV ab.

Der Mittelwert von Q unter synthetischem Sekretin errechnet sich auf 0,48 ( Tab.1 III bzw. III$^{*}$) und überschreitet signifikant den vergleichbaren Wert von I. ( $p \lesssim 0{,}06$ )

Abbildung 4 ( oben ) zeigt jedoch, daß die Q-Werte bei Sekretionsraten des Saftflusses bis 3 ml/5 Min. annähernd konstant bei 0,35 $\mu$Eq $Ca^{++}$/mg Protein liegen und nur bei höheren Sekretionsraten ansteigen.

In diesem Bereich gehen die Proteinkonzentrationen asymptotisch gegen 0,01 bis 0,03 g% ( Abb. 3, 4 ) . Dieser Bereich der Sekretionsraten wurde jedoch in den Experimenten mit biologischen Sekretin, das bei offener Durchströmung mit KHB verabreicht wurde, nicht erreicht.

Hieraus resultiert, daß der Calcium-Protein-Quotient von III nicht mit dem entsprechenden Wert von I. und IV. verglichen werden kann.

Der Calcium-Protein-Quotient unter synthetischem Sekretin ( Abb. 4 ) zeigt innerhalb eines entsprechenden Sekretionsbereich des Pankreassaftes wie er unter biologischem Sekretin erreicht wird, vergleichbare Werte von 0,35 uEq $Ca^{++}$/mg Protein.

Die Wirkung erhöhter Calcium-Konzentrationen im Perfusionsmedium auf das Verhältnis von Calcium im Pankreassaft und Enzymprotein.

Der Einfluß erhöhter extrazellulärer Calciumkonzentrationen auf die Calciumsekretion wird durch 2 repräsentative Beispiele aus 5 Experimenten dargestellt ( Abb. 7 ).

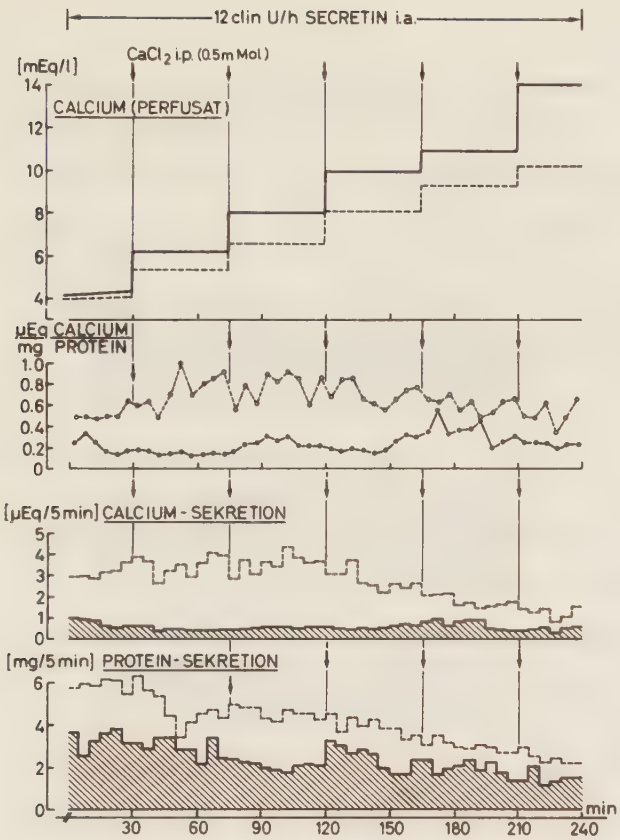



Abb. 7: 2 von 5 repräsentativen Experimenten mit stufenweiser Steigerung der Perfusatkonzentration von Calcium durch Bolusinjektionen (↓) von 0,5 mMol $CaCl_2$ (0,2 M) in das Reservoir (i.p.) von 400 ml Blut. Fortlaufende hydrokinetische Stimulation mit biologischem Sekretin (Mutt). Die Kontrollperiode von 0-30 Min. repräsentiert einen steady state der Volumen-, Protein- und Calcium-Sekretion.

Wird die Perfusat-Konzentration bei rezirkulierender Durchströmung des isolierten Organs mit 400 ml autologen Blutes stufenweise von etwa 4 auf max. 14 mEq/l durch Einzelinjektionen von 0,5 mMol $CaCl_2$ ( 0,2 M ) in das Blutreservoir ( i.p. ) angehoben, so wird keine signifikante Änderung der Calcium- oder Proteinausscheidung bei kontinuierlicher Stimulierung mit Sekretin beobachtet.

Der Calcium-Protein-Quotient zeigt nur kurzzeitige minimale Anstiege und spiegelt die extrazelluläre Calcium-Konzentration im Perfusat unzuverlässig wieder ( Abb.7 ).

Diese Experimente zeigen, daß die Anhebung des Calciumgradienten zwischen dem Intravasal- bzw. Extrazellulärraum und dem Gangsystem bzw. dem Intrazellulärraum nicht notwendigerweise im Bereich der erzielten Perfusat-Konzentrationen von $Ca^{++}$ zu einer Mehrsekretion von Calcium führen.

Um an eine Anpassung der Pankreaszelle an konstant erhöhte Calciumkonzentrationen auszuschließen, wurde nach der Methode von Schulz et al. isotonische Calciumlösung intraarteriell als Bolus verabreicht und dadurch vorübergehend die Perfusatkonzentration auf Werte von 8 - 18 mEq/l für die Dauer von 3-6 Min. angehoben ( Abb. 8 ).

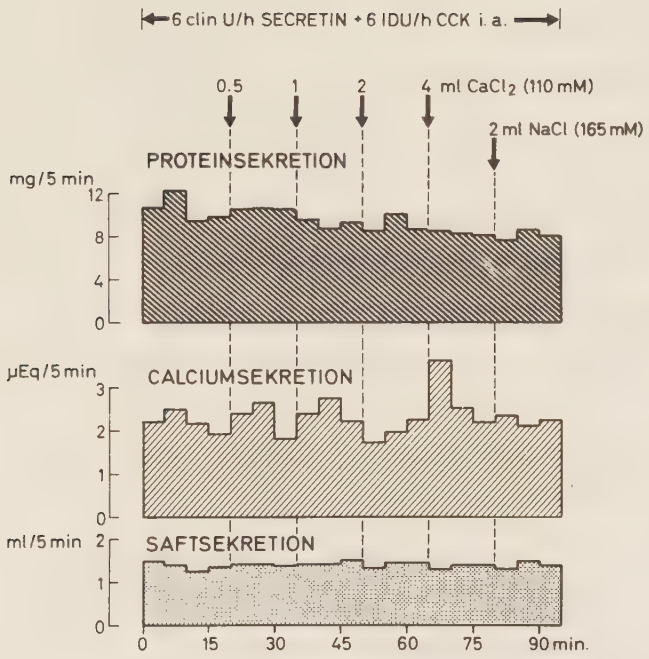



Abb. 8: Intraarterielle einmalige Injektion von 0,5 - 4 ml $CaCl_2$ (110 mM) während fortlaufender submaximaler Stimulation mit Sn + CCK. Isotonische $NaCl_2$- Lösung (165 mM) wurde als Kontrolle injiziert. Ein repräsentatives Experiment von 18 (siehe auch Tab. 2 ). Die Testperioden folgen einer Vorperiode konstanter hydrokinetischer und ekbolischer Organfunktion. Bei nicht-rezirkulierender Perfusion enthält das Perfusionsmedium (KHB) $10^{-6}$M Atropin, um cholinerge Nebenreaktionen des Calciums auszuschließen.

Isotonische $CaCl_2$-Lösung wurde bei einem Minutenvolumen des Perfusates von 30 ml innerhalb einer Minute appliziert. Hierbei kommt es in Abhängigkeit von der jeweils erzielten Perfusat-Konzentration zu geringgradigen, jedoch signifikanten Anstiegen der Calciumkonzentration und der Gesamtausscheidung von Calcium im Pankreassaft ( Abb. 8 ).

Abbildung 8 repräsentiert ein typisches Beispiel der beschriebenen Versuchsanordnung aus insgesamt 18 analogen Experimenten ( Tab. 2 ).

Die Saftsekretion blieb unter diesen Bedingungen während der Testperioden konstant.

Abbildung 9 zeigt den Ablauf der Calcium-Konzentration im venösen Effluat im Anschluß an die intraarterielle Bolusinjektion von $CaCl_2$.

Die Schwellendosis von 110 mM $CaCl_2$, die zu einer signifikanten Veränderung der Calciumsekretion führte, liegt bei 1-2 ml. Hierbei steigt die Calciumkonzentration im venösen Effluat auf 8-12 mEq/l an.

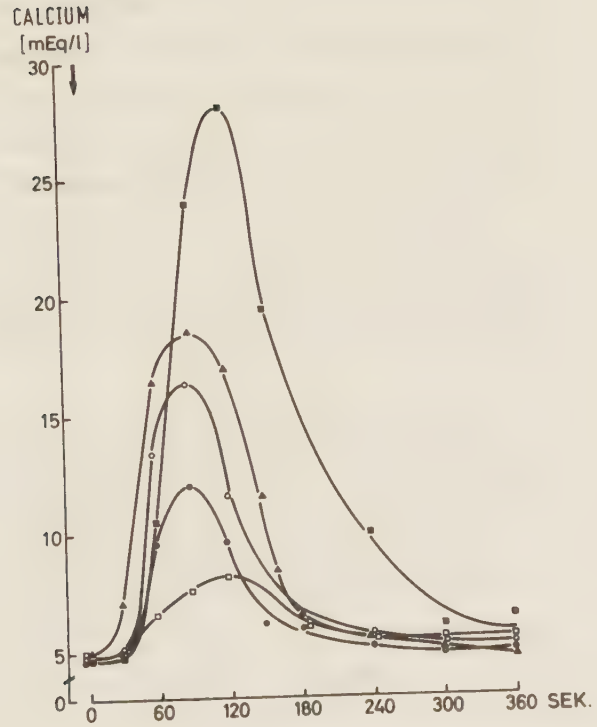



Abb. 9: Ablauf der Calciumkonzentration im venösen Effluat nach intraarterieller Bolusinjektion von isotonischer $CaCl_2$-Lösung (110 mM) bei nicht-rezirkulierender Perfusion mit KHB (-30 ml/Min.)
□----□ 1ml; ●----● 2ml; ○----○ 4ml;
△----△ 8ml; ■----■ 1ml 2M $CaCl_2$

Die Erhöhung der Calciumkonzentrationen im Perfusat bei offener Durchströmung mit KHB durch kontinuierliche Infusion einer 0,2 M $CaCl_2$-Lösung über einen Zeitraum von 5-10 Minuten verdoppelt die Sekretion von Calcium unter kontinuierlicher Stimulierung mit Sekretin allein bzw. unter Sekretin + CCK ohne jedoch die basale oder ekbolisch stimulierte Enzymsekretion signifikant zu steigen. Die Saftsekretion bleibt auch unter diesen Stimulationsbedingungen unverändert konstant.

Nur bei höheren Perfusat-Konzentrationen ( 90 - 180 mEq $Calcium^{++}$/l ), die pharmakologische Dosen darstellen und unter Infusion bzw. Injektion von 2 M $CaCl_2$-Lösung erreicht werden, ergibt sich ein signifikanter Anstieg der stimulierten Proteinsekretion um 80 %, der jedoch den Effekt einer äquimolaren Kochsalzlösung nicht übersteigt. Der Effekt einer hohen Konzentration von $CaCl_2$ auf die Proteinsekretion ist auf seine hyperosmolare Wirkung zu beziehen, wie der Vergleich mit der äquiosmolarer Kochsalzlösung zeigt. Hierauf weist auch die Abnahme der Saftsekretion hin ( Teufel et al. 1977 ). ( $34_a$)

Tabelle 2 vergleicht die Mittelwerte der Calcium- und Proteinsekretion und der Calcium-Protein-Quotienten von 3 aufeinanderfolgenden Sammelperioden zu je 5 Minuten vor und nach intraarterieller Bolusinjektion von 1-10 ml $CaCl_2$ ( 110 mM ) bei kontinuierlicher Stimulation mit Sekretin + CCK bzw. Acetylcholin.

Diese Experimente wurden bei offener Perfusion mit Krebs-Henseleit-Lösung ( 2,5 $CaCl_2$ ) durchgeführt.

Unter diesen Versuchsbedingungen nehmen die Calciumkonzentration im Pankreassaft, Gesamtausscheidung von Calcium und der Calcium-Protein-Quotient nach Injektion von $CaCl_2$ geringgradig, jedoch signifikant gegenüber der Vergleichsperiode vor Injektion von $CaCl_2$ zu, wenn sie im Student-T-Test für gepaarte Daten verglichen werden. ( Tab. 2 )

Die Größenordnung des Anstieges liegt zwischen 12 und 30 % für die jeweiligen Parameter.
Die Gesamtausscheidung des Proteins wird jedoch durch die Anhebung der Perfusat-Konzentration von Calcium ( Abb. 9 ) nicht signifikant verändert.

Auch der Vergleich der Sammelperioden über 5 Min. vor und nach Injektion von $CaCl_2$ ergibt keinen signifikanten Unterschied in der Proteinsekretion.

Tab. 2

| | $\bar{d}$ | n | p | $\bar{x} \pm$ SD Kontrollperiode | Änderung von $\bar{x}$ in % |
|---|---|---|---|---|---|
| Proteinsekretion (mg/ 5 Min.) | 0.05 | 64 | n. s. | 6.41 ± 4.5 | 0.78 |
| Calciumsekretion (µEq/5 Min.) | 0.548 | 59 | 0.05 | 1.82 ± 0.68 | 30.1 |
| Calciumkonzentration ( µEq/l) | 0.207 | 59 | 0.01 | 1.63 ± 0.9 | 12.7 |
| µEq $Ca^{++}$/mg Protein (Q) | 0.109 | 59 | 0.0025 | 0.35 ± 0.21 | 31.1 |
| Saftsekretion (ml/5 Min.) | 0.12 | 64 | n.s. | 1.65 ± 0.3. | 7.2 |

Tab. 2 Die Mittelwerte der Meßdaten von 3 aufeinanderfolgenden Sammelperioden à 5 Min. vor und nach einer Bolusinjektion von 1 - 10 ml $CaCl_2$ (110 mM) werden miteinander verglichen. (Student- T - Test für gepaarte Daten)
$\bar{d}$ = Mittelwert der Differenz ; n = Zahl der Paare aus 18 Experimenten.
$\bar{x} \pm$ SD : Mittelwert der Meßwerte der vorausgehenden Kontrollperiode.
Die prozentuale Änderung wurde aus dem Quotienten von $\bar{d}$ u. $\bar{x}$ errechnet.
Die Experimente wurden unter konstanten Stimulations- u. Sekretionsbedingungen unter Sn + CCK bei nicht-rezirkulierender Durchströmung mit KHB durchgeführt.

Um den Einfluß von verschiedenen Perfusionsmedien auf den transmembranösen Calciumtransport bzw. die Verfügbarkeit von Calcium für die Calciumsekretion zu untersuchen und insbesondere zum Ausschluß einer intravasalen Ausfällung von unlöslichem Calcium-Phosphat bei hohen Perfusatkonzentrationen, wurde bei offener Perfusion eine KHB-Lösung ohne Phosphat-Puffer sowie die von I.Schulz et al. (29, 30) angegebene Perfusionslösung (ohne Phosphat-Puffer) verwendet.

Hierdurch sollte im Vergleich mit dem von I.Schulz et al. (29,30) beschriebenen deutlichen ekbolischen Effekt von exogenem Calcium der Faktor unterschiedlicher Perfusionsmedien erfaßt werden und eine mögliche artspezifische Differenz im Sekretionsverhalten zwischen Hund und Katze untersucht werden.

Es wurde das isolierte Organ zunächst mit der in den vorausgehenden Experimenten verwendeten KHB-Lösung mit 2,5 mM $Ca^{++}$ und 6 g% Dextran T 60 verwendet.

Im Anschluß an diese Kontrollperiode wird sowohl mit KHB-Lösung + 6 g% Dextran T 60 + 2,5 mM $CaCl_2$ jedoch ohne Phosphat-Puffer als auch mit dem Perfusionsmedium von Schulz et al. (ohne Dextran, ohne Phosphat-Puffer und 1,25 mM $CaCl_2$) durchströmt.

Abbildung 10 zeigt die Calcium- und Proteinsekretion nach intraarterieller Injektion von verschiedenen Dosen von $CaCl_2$ ( 110 mM ).

Während der Perioden unterschiedlicher Perfusionsmedien zeigt sich keine signifikante Differenz der Calcium- und Proteinsekretion bzw. des Calcium-Protein-Verhältnisses im Anschluß an die Injektion von 1-10 ml $CaCl_2$.

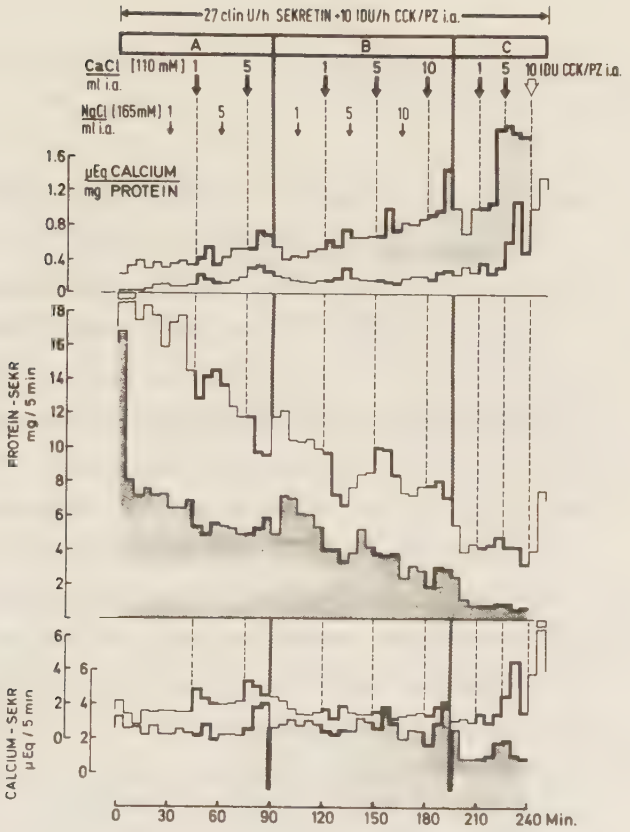



Abb. 10 : Das Verhalten der Protein- und Calciumsekretion unter Sn + CCK nach Injektion (↓) von $CaCl_2$ (110 mM) i.a. nach offener Durchströmung mit unterschiedlichen Perfusionsmedien.

A : KHB, Zusammensetzung siehe Methodik (=2.5 mM $Ca^{++}$).

B : modifizierte KHB-Lösung nach Schulz et al. d.h. 1.25 mM $Ca^{++}$, Fehlen von $Na_2HPO_4$ und Dextran.

C : KHB ( s.o. ) ohne $Na_2HPO_4$.

2 repräsentative Experimente

n = 4

## Diskussion:

I. Seit den Untersuchungen am wachen Fistelhund ( Goebell et al., 18; Zimmermann et al., 36,37 ) ist das korrespondierende Verhalten der Enzym- und Calcium-Sekretion im Verlauf ekbolischer Stimulierung bewiesen. Die Experimente am isoliert durchströmten Hundepankreas ergeben damit übereinstimmende Resultate und versuchen, die quantitative Beziehung zwischen der Calcium- und Protein-Sekretion unter verschiedenen sekretorischen und stimulatorischen Bedingungen weiter zu präzisieren.

a. in verschiedenen Phasen der Saft- und Protein-Sekretion nach Einzelinjektionen hydrokinetischer oder ekbolischer Sekretagoga und

b. während stufenweiser Änderungen einer kontinuierlichen Infusion von Sekretin bzw. Sekretin + CCK oder Acetylcholin sowie

c. bei Änderungen der extracellulären Calciumkonzentration.

Sowohl während der Periode des initialen Auswasch-Phänomens von im Gangsystem während basaler Sekretionsperioden angehäufter Enzymproteine nach einer Stimulation von Sekretin als auch im Verlauf der maximalen Sekretionsrate von Enzymproteinen nach

ekbolischen Sekretagoga nimmt die Gesamtsausscheidung an Protein in einem höheren Maße zu als die Sekretion von Calcium. Während dieser kurzen Perioden exzessiver Proteinausscheidung spiegelt der Calcium-Protein-Quotient im Pankreassaft annähernd die enzymassoziierte Calciumfraktion wieder und ist mit dem Calciumgehalt der Zymogengranula vergleichbar.

Der Calcium-Protein-Quotient aus der initialen Sammelperiode über 5 Minuten, die der Bolusinjektion von Sekretin oder CCK folgt, fällt um den Faktor 5 bis 6 gegenüber den vorausgehenden oder nachfolgenden Kontrollperioden im steady state ab und erreicht im Falle von Sekretin 0,0947 $\pm$0,04 SD $\mu$Eq$Ca^{++}$/mg Protein ( n=18 ) und im Falle von CCK 0,0755$\pm$0,05 ( n=15 ).

Diesen Meßwerten entspricht eine Calcium-Proteinrelation von 47,8 bzw. 37,7 nM Calcium/mg Protein. Diese Werte entsprechen den Angaben der Literatur ( Ceccarelli et al., 9; Goebell et al., 16,17,18 ).

Aus dem Mittelwert des Calcium-Protein-Quotienten während kontinuierlicher Stimulierung mit Sekretin bzw. Sekretin + CCK ( 0,357 bzw. 0,319 $\mu$Eq/mg ) resultiert eine Calcium-Konzentration von 179 bzw. 159 nM Calcium/mg Protein.

Diese Meßwerte weisen auf eine zusätzliche enzymabhängige Calciumfraktion hin.

In den Experimenten mit synthetischem Sekretin bleibt die Calciumkonzentration im Pankreassaft bei hohen Sekretionsraten des Saftflusses annähernd konstant bei 0,46 mEq/l, während die Protein-Konzentration auf Werte zwischen 0,01 bzw. 0,03 g% abnimmt.

In diesem unteren Bereich der Proteinkonzentration erreicht der Q-Wert sein Maximum von 1,5 bis 4,6 $\mu$EqCa$^{++}$/mg Protein.

In Wirklichkeit steigt der Wert von Q in Abbildung 3 auf 1,4 bei Sekretionsraten von 4-5 ml/ 5 Min. an.

Der Y-Abschnitt der Regressionsgeraden aus der Korrelation der Calcium- und Protein-Konzentration ( Tafel 1, I, III ) bei ausschließlicher Stimulierung mit Sekretin zeigt ebenfalls die Größe der postulierten enzymunabhängigen Calciumfraktion im Pankreassaft an. ( Argent et al., 1,2 )

Nach einer überschlagsmäßigen Berechnung macht die enzymunabhängige Calciumkonzentration von 0,45 mEq/l (= Mittelwert der Ordinatenabschnitte aus Tabelle 1, I, III, IV ) etwa 15 bis 22,5 % der gesamten Calciumausscheidung während der Phase des " Wash-out " oder der maximalen Sekretionsrate von Enzymproteinen aus, wenn die Calciumkonzentration im Pankreassaft etwa

2 - 3 mEq/l erreicht.
Bei kontinuierlicher Stimulierung mit Sekretin oder Sekretin + CCK ( Abb. 6 ) erreichen die Mittelwerte der Calciumkonzentrationen 0,8 ± 0,27 ( III ) bzw. 1,38 ± 0,67 mEq/l ( IV ).

Der prozentuale Anteil der proteinunabhängigen Calciumsekretion steigt auf etwa 56% im Falle ausschließlicher hydrokinetischer Stimulierung mit Sekretin und auf 32% im Falle der zusätzlichen ekbolischen Stimulierung mit CCK oder Acetylcholin. ( IV )

Nimmt man einen 15 - 22,5 %igen Anteil der enzymunabhängigen Calciumsekretion während der maximalen Enzymsekretion an, so müßte der gemessene Wert von 47,8 bzw. 37,7 nM $Ca^{++}$/mg Protein wie oben angegeben korrigiert werden auf 40,6 bzw. 32 nM $Ca^{++}$/mg Protein ( 15% ) bzw. auf 37 - 29,2 nM $Ca^{++}$/mg Protein ( 22,5% ).

Diese errechneten Werte ergeben im Mittel 35 nM $Ca^{++}$/mg Protein und entsprechen den Messungen an isolierten Zymogengranula von 36 nM $Ca^{++}$/mg Protein . ( Ceccarelli et al., 9 )

Der jeweils variable Anteil der enzymassoziierten und enzymunabhängigen Calciumfraktion im Pankreassaft sowohl während der verschiedenen Sekretionsphasen eines Einzelreizes als auch während verschiedener stimulatorischer Bedingungen bei kontinuierlicher Stimulation, erklären den Wechsel des Calcium-Portein-

Quotienten, wie er sich in vivo sowohl am narkotisierten Hund als auch am Meerschweinchen ergibt.

Goebell et al. ( 18 ) und Ceccarelli et al. ( 9 ) nahmen 2 verschiedene Calciumfraktionen im Pankreassaft an, von denen nur eine mit der stimulierten Enzymsekretion korreliert.

Die andere Fraktion, die vorwiegend durch Sekretin ausgeschieden wird, wurde als eine proteinunabhängige, in keiner Beziehung zur Enzymsekretion stehende Calciumausscheidung angenommen.

Im Gegensatz zu diesen Befunden zeigen die Studien am isoliert durchströmten Hundepankreas eine hochsignifikante Korrelation zwischen der Calcium- und Proteinkonzentration im Pankreassaft während kontinuierlicher Stimulierung mit biologischem und synthetischem Sekretin ( Abb. 5,6, Tabelle 1, I, II, III ), sogar in Abwesenheit von extracellulär verfügbarem Calcium.

Hierbei wurden die initialen Meßwerte der Auswasch-Phase ductulär akkumulierter Enzymproteine über 10 bis 15 Minuten eliminiert.

Bei hohen Sekretionsraten der Saftsekretion ( Abb.3 ) tendiert die Proteinkonzentration gegen 0,01 g%, während die Calcium-Konzentration auf einer Konzentrationshöhe von 0,46 mEq/l über einen großen Bereich der Sekretionsraten des Saftflusses konstant bleibt.

Diese Calciumfraktion scheint von der Enzymsekretion weitgehend unabhängig zu sein.

Abb. 5, III* zeigt jedoch überzeugend eine hochsignifikante positive Korrelation und lineare Regression der Calcium- und Protein-Konzentration im Pankreassaft, sogar in dem niedrigen Konzentrationsbereich des Proteins, der dem flachen Kurvenabschnitt der hyperbolischen Beziehung zwischen der Protein- und Saftsekretion in Abb. 4 ( oberer Teil ) entspricht.

Das korrespondierende Verhalten der Calcium- und Proteinkonzentration im Bereich niedrigerer Sekretionsraten ( Abb.3 ) zeigt, daß in Verbindung mit der Zunahme der basalen Enzymkonzentration die Calciumkonzentration den konstanten Spiegel von 0,46 µEq/ml übersteigt, der bei Sekretionsraten zwischen 3 und 6 ml/ Min. aufrecht erhalten wird.
Dieser Anstieg ist offensichtlich mit dem höheren Anteil an enzymassoziierten Calcium verbunden.

Ein kurzes Beispiel soll die quantitative Relation von enzymassoziierten und enzymunabhängigem Calcium bei unterschiedlichen Sekretionsraten klären.

Der Mittelwert der " basalen ", unstimulierten Proteinsekretion bei kontinuierlicher Infusion von synthetischem Sekretin berechnet sich auf 3,3 mg/ 5 Min. ( Abb. 4 ).

Bleibt die Proteinsekretion über den gesamten Bereich der durch hydrokinetische Stimulation erreichbaren Volumensekretion nahezu konstant, wie sich aus Kontrollexperimenten ( nicht dargestellt ) ergibt, so würde eine mittlere " basale " Proteinsekretion von 3,3 mg/ 5 Min. bei einer Sekretionsrate von 6 ml/ 5 Min. einer Proteinkonzentration von 0,55 mg/ml entsprechen.
Dieser errechnete Wert stimmt gut mit den Meßwerten der Abb. 3 überein.

0,55 mg/ml Protein binden 0,038 µEq/ml $Ca^{++}$, wenn man ein quantitatives Calcium-Protein-Verhältnis von 35 nM $Ca^{++}$/mg Protein zugrunde legt, welches sich aus der Berechnung der Calcium-Protein-Relation aus der enzymassoziierten Calciumfraktion sowie aus der Literatur ( Ceccarelli et al., 9 ) ergibt.

0,038 µEq/ml $Ca^{++}$ entsprächen nur 8,26% der Calciumkonzentration von 0,46 µEq/ml, wie sie bei hohen Sekretionsraten von 6 ml/5 Min. gemessen werden.

Bei einer Sekretionsrate von 0,5 ml/5 Min. erreichen die proteinassoziierten und die enzymunabhängigen Calciumfraktionen jedoch etwa gleiche Größenordnung. Die proteinabhängige Calciumfraktion verdoppelt den Wert der enzymunabhängigen.

Diese Überlegungen erklären die hoch signifikante Korrelation zwischen der unstimulierten basalen Proteinausscheidung und der Calciumkonzentration auch bei ausschließlich hydrokinetischer Stimulation. ( Abb. 5 u. 6 )

Diese Ergebnisse beweisen die Existenz von 2 unabhängigen Fraktionen von Calcium im Pankreassaft wie von Case et al. ( 5 ), Goebell et al. ( 16, 17, 18 ) und Ceccarelli et al. ( 9 ) betont wird.

Ein Anteil des sezernierten Calciums ist sowohl an die basale als auch an die stimulierte Enzymfreisetzung der Azinuszellen assoziiert und wird bei der Exocytose der Zymogengranula frei.

Die andere Calciumfraktion scheint in das Gangsystem in Abhängigkeit von der extracellulären bzw. plasmatischen Calciumkonzentration zu gelangen. Der exakte Mechanismus ist ungeklärt. Es bestehen zwei Möglichkeiten:

1.) Eintritt von Calcium in das ductuläre Lumen durch intercelluläre Diffusion aus dem interstitiellen Raum entsprechend einem Konzentrationsgradienten.
2.) Aktiver transmembranöser Calciumtransport an der luminalen Zellmembran ductulärer Zellen möglicherweise in funktioneller Verbindung mit Vorgängen der Elektrolytsekretion.

Das inverse Verhältnis der Calciumkonzentration zu den jeweiligen Sekretionsraten des Pankreassaftes hängt vom Verhältnis von enzymassoziiertem und enzymunabhängigem Calcium ab.

Das Sekret der Azinuszellen, das vorwiegend enzymassoziiertes Calcium enthält, wird während der ductulären Passage mit dem Sekret der Gangepithelien vermischt, das seinerseits keine Enzyme beinhaltet und aktiv sezerniertes oder passiv diffundierendes proteinungebundenes Calcium enthält.

Die Konzentration der proteinunabhängigen Calciumfraktion scheint über einen großen Bereich der höheren Sekretionsraten der Wasser- und Elektrolytausscheidung konstant zu bleiben. ( Abb.3 )

Der Unterschied zwischen unseren Ergebnissen und der fehlenden Korrelation zwischen der Calcium- und Proteinsekretion unter ausschließlicher Stimulierung mit Sekretin bei Ceccarelli et al. ( 9 ) und Goebell et al. ( 16,17,18 ) ist nicht auf Verunreinigungen von biologisch reinem Sekretin ( Mutt ) durch CCK zurückzuführen, da sie auch nach Verwendung von synthetischem Sekretin ( Wünsch ) nachweisbar wird.

Die quantitativen Beziehungen zwischen der Calcium- und Proteinsekretion bleiben unter biologisch reinem und synthetischem Sekretin unverändert.

Die positive Korrelation zwischen Calcium und Protein ergibt sich wohl aus der großen Anzahl von Meßwerten, die über den gesamten Bereich der Sekretionsraten der hydrokinetischen Organfunktion verteilt sind.

Die Gesamtausscheidung von basalem, unstimulierten Enzymprotein bleibt im Mittel bei unterschiedlicher hydrokinetischer Stimulierung durch Sekretin über den gesamten Bereich der erzielten Sekretionsraten des Saftflußes nahezu konstant.

Ein geringgradiger Anstieg der basalen Proteinausscheidung ist jedoch im Bereich der Sekretionsraten zwischen 0 und 3 ml/5 Min. zu beobachten.

Er scheint nicht allein auf ein " Wash-out-Phänomen " zurückgeführt werden zu können. ( Abb.4 )

Der Calcium-Protein-Quotient beträgt in vivo nach den Untersuchungen von Goebell et al. ( 16,17,18 ) bei hydrokinetischer Stimulierung 0,7 und bei kombinierter Stimulierung mit Sekretin und ekbolischen Sekretagoga 0,1 µEq $Ca^{++}$/mg Protein.

In unseren Untersuchungen liegen die Q-Werte bei ausschließlicher hydrokinetischer Stimulierung bei 0,357 und unterscheiden sich nicht signifikant von den Werten unter Sekretin + CCK ( 0,319 ), obwohl eine zwei- bis dreifache Enzymsekretion zu beobachten ist.

Die Steigungen der verschiedenen Regressionsgeraden sind unter hydrokinetischen bzw. ekbolischen Versuchsbedingungen vergleichbar. ( Abb.6, Tabelle 1, III, IV ) und weisen auf die vorherrschende Rolle der enzymabhängigen Calciumfraktion unter beiden Stimulationsbedingungen hin.

Die Calcium-Protein-Quotienten steigen nur bei hohen Sekretionsraten des Pankreassaftes auf Meßwerte an, wie sie Goebell et al. ( 18 ) am wachen Fistelhund beobachten konnte.

Der Mittelwert der Q-Werte aus dem gesamten Bereich der Sekretionsraten unter Sekretin liegt bei 0,47 µEq/mg.

Q-Werte aus der durch Sekretin induziierten Auswaschperiode und während des Maximums der Enzymausscheidung nach CCK bzw. Acetylcholin ( 0,07 bzw. 0,09 µEq/mg ) entsprechen jedoch den Werten, die von Goebell et al. ( 16,17,18 ) nach ekbolischen Sekretagoga beschrieben werden.

Bei Durchströmung des isolierten Pankreas mit calciumfreiem Perfusat sowohl während kontinuierlicher Stimulierung mit Sekretin als auch mit Sekretin + CCK ist sowohl eine signifikante Abnahme ( $p < 0{,}005$ ) der Regressionskoeffizienten bzw. der Steigung der Regressionsgeraden aus der Beziehung von Calcium- und Proteinkonzentration als auch eine Abnahme der jeweiligen

Ordinatenabschnitte bei einer fiktiven Proteinkonzentration von 0 mg% und ein Abfall des Calcium-Protein-Quotienten im Vergleich zur calciumhaltigen Kontrollperiode festzustellen ( Tabelle 1, II, IV ) .

Diese Beobachtung ist vorwiegend auf eine Verminderung der proteinunabhängigen Calciumsekretion zurückzuführen und weist auf eine Abhängigkeit der letzteren von der extracellulären Calciumkonzentration hin.

Die Calcium-Protein-Quotienten aus Perioden calciumfreier Perfusion ( Tab.1, II, V ) übersteigen die Vergleichswerte der enzymassoziierten Calciumfraktion unter ekbolischen Stimulationsbedingungen ( 0,07 bis 0,09 ) .

Dieser Unterschied weist darauf hin, daß auch in Abwesenheit von extracellulärem Calcium eine gewisse enzymunabhängige Calciumsekretion während der Perfusionsdauer von 45 Min. im calciumfreiem Medium fortbesteht und schließt indirekt eine vollständige Calciumverarmung des interstitiellen oder zellulären Kompartiments aus.

Zudem kann hieraus auf eine nahezu unverminderte Bindung von Calcium an die zwar im calciumfreien Medium reduziert freigesetzten Enzymproteine geschlossen werden.

Die Anlagerung von Calcium an die Enzymproteine der Zymogengranula wird bei einer Durchströmung mit calciumfreiem Medium über 45 Min. nicht entscheidend reduziert oder rückgängig gemacht.

Aus inkubierten Pankreasfragmenten der Ratte kam es nach Beobachtungen von Case und Clausen (6,7,8) auch im calciumfreien Milieu nach ekbolischer Stimulierung zu einem unveränderten Ausstrom von $^{45}Ca^{++}$ obwohl die Enzymsekretion nahezu vollständig sistierte.

Nach unseren Beobachtungen nimmt im calciumfreien Medium am isoliert durchströmten Hundepankreas sowohl die Protein- als auch die Calciumausscheidung ab.

Diese Abnahme des Calcium-Protein-Quotienten während der Periode calciumfreier Durchströmung weist darauf hin, daß die Calciumsekretion in einem höheren Ausmaß abnimmt, als es dem Abfall der Enzymsekretion entspricht.

Die Freisetzung von $^{45}Ca^{++}$ in das Inkubationsmedium aus vorequilibrierten Pankreasfragmenten scheint nicht einen wesentlichen Sekretionsmechanismus von Calcium am intakten Pankreas zu repräsentieren, da die cytoplasmatische Calciumkonzentration im Vergleich zur Calciumkonzentration im

Pankreassaft wesentlich niedriger liegt ( $10^{-5}$ bis $10^{-7}$M ).

Die niedrige cytoplasmatische Konzentration an Calcium läßt vermuten, daß bei hohem Ausstoß an enzymgebundenem Calcium eine Anreicherung von Calcium an die Enzymproteine der Zymogengranula in Form einer Chelatbindung stattfinden muß.

Diese Überlegung deckt sich mit den Befunden von Ceccarelli et al. (9), die bei einer ultrastrukturellen Fraktionierung von Zellhomogenaten den Hauptanteil des zellulären Calciums in der Fraktion der Zymogengranula nachwiesen.

Stellt die Freisetzung von Radio-Calcium nach ekbolischer Stimulierung bei calciopriver Hemmung der Enzymfreisetzung ( Case und Clausen, 6,7,8 )nicht einen regulären Sekretionsvorgang dar, so weist sie doch auf eine transzelluläre, enzymunabhängige Transportmöglichkeit von Calcium hin.

Die Untersuchungen am isoliert durchströmten Katzenpankreas ( Argent et al., 1,2 ) zeigen eine direkte proportionale Beziehung zwischen der Calciumkonzentration im Perfusat- und Pankreassaft. Hieraus wurde auf einen Übertritt von frei-diffusablem Calcium in das Gangsystem geschlossen.

Die stufenweise Anhebung der Calcium-Konzentrationen im Perfusat ( Blut ) auf Werte von 10 bis 14 mEq/l führt jedoch zu keiner Vermehrung der Gesamtausscheidung an Calcium oder Protein ( Abb.7 ) bei kontinuierlicher Stimulierung mit Sekretin.

Diese Befunde stehen im Widerspruch zu Beobachtungen am Menschen und am perfundierten Katzen-Pankreas ( Goebell et al., 16,17; I.Schulz et al., 31 ), die eine Zunahme der Calcium- und Enzymsekretion bei erhöhten extrazellulären Calciumkonzentrationen beschreiben.

Möglicherweise werden durch die Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration insbesondere nach Bolusinjektion in vivo oder am isolierten Katzenpankreas über cholinerge Mechanismen Neurotransmitter oder bei erhaltenem Duodenum endogene ekbolische Hormone freigesetzt.

Die Beobachtungen von Goebell et al. ( 16,17 ) weisen in diese Richtung, da der ekbolische Calciumeffekt durch Atropin vollständig hemmbar war.

Auch am isolierten Katzen-Pankreas nahm die durch Calcium erhöhte Enzymsekretion in Gegenwart von Atropin um 70% ab.

In unserer Organpräparation werden durch die vollständige Skelettierung des Organes und insbesondere durch die Abtrennung des eng an den Pankreaskopf adhaerenten Duodenalstumpfes eine möglicherweise durch Calcium induzierte duodenale endogene Hormonfreisetzung bzw. duodene-pankreatische Reflexe ausgeschlossen.

Nach Bolusinjektionen von isotonischer $CaCl_2$-Lsg. (Abb.9) kommt es auch am isoliert durchströmten Hunde-Pankreas bei offener Perfusion mit KHB, das keine plasmatischen, calciumbindenden Proteine wie bei rezirkulierender Durchströmung mit autologem Blut enthält, zu einer signifikanten Erhöhung der proteinunabhängigen Calciumsekretion.

Eine Steigerung der Enzymfreisetzung ist jedoch hierdurch nicht auszulösen.

Die rasche Zunahme der Calciumsekretion nach Bolusinjektionen von $CaCl_2$ entspricht den Beobachtungen von Ceccarelli et al. ( 9 ) und Schreurs et al. ( 29 ), die einen raschen Übertritt von extrazellulärem Calcium in das Gangsystem durch Studien mit Radio-Calcium nachweisen konnten.

Diese, wie unsere Befunde sprechen für eine Austauschmöglichkeit zwischen extrazellulärem bzw. interstitiellen Calcium und dem ductulären Raum in Abhängigkeit vom jeweiligen Konzentrationsgradienten.

## Zusammenfassung:

Am isoliert durchströmten Hundepankreas wurde das Sekretionsverhalten von Calcium und das quantitative Verhältnis von Calcium und Enzymprotein im Pankreassaft unter hydrokinetischer und ekbolischer Stimulierung untersucht und der Einfluß verschiedener Calciumkonzentrationen im Perfusionsmedium auf die einzelnen Meßwerte untersucht.

1. Es besteht sowohl bei hydrokinetischer Stimulierung mit Sekretin als auch unter ekbolischen Sekretagoga ( CCK, Acetylcholin ) eine signifikante Korrelation zwischen der Calcium- und der Proteinsekretion. Biologisch reines und synthetisches Sekretin unterscheiden sich nicht im Verhalten der jeweils induzierten Calcium- und Proteinsekretion.

2. Der an das Enzymprotein gebundene Calciumanteil des Pankreassaftes beträgt 35 nMol/mg Protein. Dieses Mengenverhältnis wird unter den hydrokinetischen und ekbolischen Stimulations- und Sekretionsbedingungen aufrechterhalten.

3. Die Calcium- und Proteinkonzentration im Pankreassaft zeigen eine hyperbolische Beziehung zur stimulierten Flußrate des Pankreassaftes. Bei einem Saftfluß über 3 ml/5 Min. nähert sich die Calciumkonzentration asymptotisch ihren tiefsten Werten um 0,46 mEq/l. Die Proteinkonzentration geht hierbei gegen 0,1 g%. Die Regressionsgerade aus der Korrelation von Calcium und Protein schneidet die Ordinate bei 0,48 mEq/l $Ca^{++}$. Dies weist ebenfalls auf eine proteinunabhängige Calciumfraktion analoger Größenordnung hin. Sie bleibt bei unterschiedlichen Flußraten des Pankreassaftes konstant.

4. Im calciumfreiem Medium wird die Korrelation der Calcium- und Proteinsekretion aufrecht erhalten. Der Anteil der proteinunabhängigen Calciumfraktion nimmt jedoch signifikant ab.

5. Die Erhöhung der Calciumkonzentration im Perfusionsmedium führt zu einer Zunahme der Calciumausscheidung im Pankreassaft, ohne die Sekretion des Enzymproteins signifikant zu beeinflussen. Dies betrifft sowohl die basale als auch die stimulierte Proteinsekretion.

Das als Chelat an das Protein gebundene Calcium scheint bei hydrokinetischer Stimulierung je nach Flußrate des Pankreassaftes durch die eine konstante, proteinunabhängiges Calcium enthaltende Saft- und Elektrolytsekretion verdünnt zu werden. Bei hydrokinetischer und ekbolischer Stimulierung ändert sich das Mischungsverhältnis beider Calciumfraktionen je nach Sekretionsphase und bestimmt den jeweiligen Calcium-Protein-Quotienten. Eine Steigerung der Perfusatkonzentration von Calcium beeinflußt lediglich die proteinunabhängige Calciumfraktion des Pankreassekretes. Ein transduktulärer Transport aus dem interstitiellen Raum ist anzunehmen, der vom Konzentrationsgradienten beeinflußbar erscheint.

## Literaturverzeichnis

1. Argent, B.E., Case, R.M., Fraser, M.P. and Scratcherd, T.:

The effects of calcium on volume and amylase secretion from the perfused cat pancreas.

J. Physiol. Lon. 224: 29 - 30 ( 1972 )

2. Argent, B.E., Case, R.M., and Scratcherd, T.:

Amylase secretion by the perfused cat pancreas in relation to the secretion of calcium and other electrolytes and as influenced by the external ionic environment.

J. Physiol. Lon. 230: 575 - 593 ( 1973 )

3. Astrup, P.:

Eine einfache elektromotorische Technik zur Bestimmung des Kohlendioxyddruckes im Blut und Plasma-Gesamtgehaltes an Kohlendioxyd im Plasma und Bikarbonat-Gehaltes im abgetrennten Plasma bei festem Kohlendioxydgehalt ( 40 mm Hg )

Scand.J.Clin, und Lab. Investigation 8, 33 ( 1956 )

4. Case, R.M.:

Calcium and gastrointestinal secretion

Digestion 8: 269 - 288 ( 1973 )

5. Case, R.M.:

Secretory processes in exocrine pancreas.

Proc. Austr. Physiol. Pharmacol. Soc. 9: 29-42 (1978)

6. Case, R.M., Clausen, T.:

Calcium ions and the release of enzymes from rat pancreas in response to gastrointestinal hormones

Acta endocrin., Kbh, Suppl. 155 ( 1971 )

7. Case, R.M., and Clausen, T.:

The relationship between calcium exchange and enzyme secretion in the isolated rat pancreas.

J. Physiol. Lon. 235: 75 - 102 ( 1973 )

8. Case, R.M., and Clausen, T.:

Fluxes of calcium$^{45}$ in rat pancreas and their relation to the extrusion of enzymes

Working Session No T7. Spoken text

9. Ceccarelli, B., Clemente, F., Meldolesi, I.:

Secretion of calcium in pancreatic juice.

J. Physiol. 245: 617 - 638 ( 1975 )

10. Cope, O., Culcer, P.J., Mixter, C., Nardi, E.L.:

Pancreatitis, a diagnostic clue to hyperparathyreodism.

Ann. Surg. 145: 857 ( 1957 )

11. Creutzfeld, W., Schmidt, H.:

Calciphylaxiepankreatitis und Pankreatitispathogenese.

Verh. dtsch. Ges. inn.Med. 71: 522 - 533 ( 1965 )

12. Dombrowsky, R.:

Studien zur Wirkung und Inaktivierung von Sekretin am isoliert duchströmten Hundepankreas.

Dissertation München 1976

13. Domschke, S., Konturek, S.J., Domschke, W., Deminski, A., Thor, P., Krol, R., Demling, L.:

Cyclic - AMP and pancreatic bicarbonate secretion in response to secretin in dogs.

Proc. Soc. Exp. Biol.and.Med. 150: 773 - 779 (1975)

14. Douglas, W.W.:

Stimulus-secretion coupling: the concept and clues from chromaffin and other cells.

Brit. J. Pharmacol. 34: 451 - 474 ( 1968 )

15. Douglas, W.W., Poisener, A.M.:

The influence of calcium on the secretory response of submaxillary gland to acetylcholine or to noradrenalin.

J. Physiol. Lon. 165: 528 - 541 ( 1963 )

16. Goebell, H.,Baltzer, G.,Schlott, K.A.,Bode, Ch.:

Parallel secretion of calcium and enzymes by the human pancreas.

Digestion 8: 336 - 346 ( 1973 )

17. Goebell, H.:

The role of calcium in pancreatic secretion and disease.

Acta Hepato-Gastroenterologica 23: 151-161 (1976)

18. Goebell, H., Steffen, Ch., and Bode, Ch.:

Stimulatory effect of pancreocymin-cholecystokinin on calcium secretion in pancreatic juice of dogs.

Gut 13: 477 - 482 ( 1972 )

19. Hermon-Taylor, J.:

A technique for perfusion of the isolated canine pancreas. Responses to secretin and gastrin.

Gastroenterology 55: 488 - 501 (1971)

20. Hokin, L.E.:

Effect of calcium omission on acetylcholine-stimulated amylase secretion and phospholipid synthesis in pigeon pancreas slices.

Biochim. biohphys. Acta 115: 219 - 221 ( 1966 )

21. Hotz, J., Minne, H., Ziegler, R.:

The influence of acute hyper- and hypocalcaemia and of calcitonin on exocrine pancreatic function in man.

Res. Exp. med. 160: 152 - 165 ( 1973 )

22. Herskovič, T., Wakim, K., Bartholomew, L., Cain, J., Jones, D.:

Relationship of calcium in the serum to that in the pancreatic secretion in normal and hypercalcemic states.

Surgery 58: 530 - 534 ( 1965 )

23. Lehnert, P., Stahlheber, H., Forell, M.M., Füllner, R., Frühauf, S., Fritz, H.,Hutzel., M., and Werle E.:

Studies on the elimination of secretin and cholecystokinin with regard to the kinetics of exocrine pancreatic secretion.

Digestion 11: 51 - 63 ( 1974 )

24. Neurath, H. In: A.V.S. De Reuck, M.P. Cammeron:Ciba foundation Symposium of the exocrine pancreas.

London, Churchill, p. 67 - 86 ( 1962 )

25. Nielsen, S.P., and Petersen, O.H.:

Transport of calcium in the perfused submandibular gland of the cat.

J. Physiol. Lon. 233: 685 - 697 ( 1972 )

26. Rasmussen, H.:

Cell communication, calcium ion and cyclic adenosine monophosphate.

Science 170: 404 - 412 ( 1970 )

27. Robberecht, P., and Christophe, J.:

Secretion of hydrolases by perfused fragments of rat pancreas: effect of calcium.

Am. J. Physiol. 220: 911 - 917 ( 1971 )

28. Rubin, R.P.:

The role of calcium in the release of neurotransmitter substances and hormones.

Pharmacol. Rev. 22: 389 - 428 ( 1970 )

29. Schreurs, V.V.A.M., Swarts, H.G.P., De Pont, I.I.H.M., Bouting, S.L.:

Role of calcium in exocrine pancreatic secretion. I. Calcium movements in the rabbit pancreas.

Biochim. Biophys. Acta 404: 257 - 267 (1975)

30. Schulz, I.:

The role of extracellular $Ca^{++}$ and cyclic nucleotides in the mechanism of enzyme secretion from the cat pancreas.

Pflügers Archiv 360 (2): 165 - 181 (1976)

31. Schulz, I., and Mannigel, H.:

Dependence of pancreatic enzyme secretion on extracellular $Ca^{++}$ and its modification by cyclic nucleotides and thyrocalcitonin.

Acta gastro-ent. belg. 37: 402 - 412 (1974)

32. Stein, E.A., Hsiu, J.L. Fischer E.H.

Alpha amylases as calcium-metalloenzymes.

Biochemestry New York 3, 56 - 61

33. Stock, K.:

Der Einfluß des extrazellulären Calciums auf die Saft-, Enzym- und Calciumsekretion des isoliert perfundierten Hundepankreas.

Dissertation München 1976

34. Teufel,H.,Stock, P.,Rohrmoser,H., und Forell,M.M.:

Der Einfluß des extrazellulären Calciums auf die Saft-, Enzym- und Calciumsekretion des isoliert perfundierten Hundepankreas.

Res. Exp. Med. 169: 221 - 241 (1977)

34a. H.Teufel, P.Stock, H.Rohrmoser, and Forell M.M.:

Calcium Secretion in the Isolated Perfused Canine Pancreas.

Res. Exp.Med. (Berl.) 176, 51 - 68 (1979)

35. Wiesmeth, A.:

Die hydrokinetische Funktion des isoliert perfundierten Hundepankreas.

Dissertation München 1973

36. Zimmermann, M.J., Dreiling, D.A., Rosenberg, I.R.: and Janowitz, H.D.:

Secretion of Calcium by the canine pancreas

Gastroenterology 52: 865 - 870 (1967)

37. Zimmermann, M.J.: Moore, E.W., Dreiling, D.A., and Janowitz, H.D.:

Pancreatic juice ionized and total calcium in dog in response to secretin, pancreozymin and calcium infusions.

J. clin. Invest. 50, 103 a.

Zu danken habe ich in erster Linie Herrn
Priv.Dozent Dr. H. Teufel für die Überlassung
des Themas und die großzügige Unterstützung
meiner Arbeit mit Rat und Tat.

Lebenslauf

Am 3. Dezember 1947 wurde ich als Sohn des Kaufmanns Go Boe Toey und seiner Ehefrau Sie Moy in Ruteng/Indonesien geboren.

Von 1954 - 1960 besuchte ich die dortige Volksschule, 1960 wechselte ich in das Gymnasium über, wo ich 1968 mein Abitur ablegte.

Im November 1969 kam ich nach Deutschland.
1970 - 1971 besuchte ich das Studienkolleg an der Universität in München.

Im S.S. 1971/72 begann ich an der Universität München das Studium der Human-Medizin und beendete es im Juli 1977 mit der ärztlichen Prüfung.

Während meiner Ausbildung als Medizinalassistent arbeitete ich von Januar - Dezember 1978 an dem Kreiskrankenhaus "St.Josef" in Kötzting.

Im Dezember desselben Jahres heiratete ich eine Deutsche aus Regensburg.
Von Januar - September 1979 war ich an der inneren Abteilung des Kreiskrankenhauses Kötzting als Assistenzarzt tätig.
Von Oktober - März 1980 arbeitete ich an der chir. Abteilung des Städtischen Krankenhauses in Moosburg.

Im April 1980 zog ich mit meiner Frau nach Nordrhein-Westfalen.

Von April 1980 - September 1981 arbeitete ich an der chir. Abteilung des Marienhospitals in Bottrop.
Ab Oktober 1981 wechselte ich in die pädiatrische Abteilung über, wo ich 1 1/2 Jahre als Assistenzarzt tätig war.
Seit April 1983 bin ich an der inneren Abteilung desselben Hauses beschäftigt.